



TITLE:

タンパク質のリン酸化修飾に関する分子生物学的研究(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

佐久間, 博行

CITATION:

佐久間, 博行. タンパク質のリン酸化修飾に関する分子生物学的研究. 京都大学, 1997, 博士(薬学)

ISSUE DATE:

1997-03-24

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/202498>

RIGHT:

氏 名	さくま ひろ ゆき 佐 久 間 博 行
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	薬 博 第 397 号
学位授与の日付	平 成 9 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	薬 学 研 究 科 製 薬 化 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	タンパク質のリン酸化修飾に関する分子生物学的研究

論文調査委員	(主 査) 教 授 川 寄 敏 祐	教 授 市 川 厚	教 授 伊 藤 信 行
--------	----------------------	-----------	-------------

論 文 内 容 の 要 旨

タンパク質のリン酸化修飾は、細胞骨格の制御、タンパク質の翻訳や代謝の制御、細胞の成長や分裂の制御、成長因子からのシグナルの伝達、遺伝子の発現調節などに深く関わっており、生体内において極めて重要な役割を果たしていることが知られている。しかしながらその作用の分子機構については未だ不明の点が多い。

申請者は、このタンパク質リン酸化修飾の生理的意義を分子レベルで理解するため、神経系に特徴的な細胞骨格タンパク質のリン酸化に関する免疫化学的研究および、タンパク質のリン酸化酵素に関する分子生物学的研究を行い、次に示すような新知見を得た。

第一章 神経系に特徴的な細胞骨格タンパク質のリン酸化を認識する単クローン抗体に関する研究

神経系には神経細胞やグリア細胞など形態的に特殊化した細胞が存在している。これらの特徴的な細胞形態の形成には細胞骨格タンパク質が重要な役割を演じていると考えられるが、これらタンパク質のリン酸化修飾については不明な点が多い。

申請者は幼弱ラット脳の膜画分を免疫原として得た単クローン抗体のライブラリーをスクリーニングする過程において、5A7 と名づけた特徴的な抗体を得た。mAb5A7 は幼弱ラット脳で一部の神経細胞とグリア細胞のファイバー状構造を特異的に認識した。生化学的手法を用いて解析したところ mAb5A7 は神経系の細胞内骨格タンパク質のうち、リン酸化されたニューロフィラメント M とネスチンの両者を認識することが明らかになった。ニューロフィラメント M 分子上の mAb5A7 が認識するエピトープはテイルドメインに位置しており、エピトープの形成にはテイルドメインのリン酸化が必要であることが明らかとなった。mAb5A7 はニューロフィラメント M とネスチンの両者を認識する初めての単クローン抗体である。またその結合特異性はリン酸化されたニューロフィラメント M のテイルドメインとネスチン分子との構造類似性を示唆している。

第二章 新規プロテインキナーゼの構造と性質に関する研究

MLK (Mix Lineage Kinase) ファミリーは最近発見されたプロテインキナーゼ群であり、その特徴として分子内にセリン／トレオニンキナーゼとチロシンキナーゼの両者の特徴を兼ね備えたハイブリッド型のキナーゼ触媒ドメインおよびロイシンジッパー構造をもつ。MLK についてはなお不明の部分が多いが、ファミリー内での多様性が知られており、その生化学的性質、生理的役割等について、解明が待たれている。

申請者は、共同研究者である Zanetta 博士から供与された機能未知のラット cDNA フラグメントをプローブとして、ヒト小脳 cDNA ライブラリーをスクリーニングした結果、新規の MLK をクローニングすることに成功した。すなわち得られた cDNA は 3569bp よりなり、2898bp の全長翻訳領域と 5'-および 3' 側非翻訳領域を含んでいた。この塩基配列から推定されたアミノ酸配列より、本タンパク質は 966 アミノ酸残基よりなり、キナーゼ触媒ドメイン、ロイシンジッパー構造、および酸性アミノ酸領域を含み、シグナルペプチドや膜貫通領域は含まないことが示された。キナーゼドメイン及びロイシンジッパー構造を持つことから申請者らは本タンパク質を LZK (Leucine-Zipper containing Kinase) と命名した。このタンパク質は MLK として分離されているマウスの DLK、ヒトの ZPK、ラットの MUK と高いホモロジーを示した。ノーザンブロット法を用いて臓器分布について検討したところヒト LZK mRNA は脾臓に最も高発現しておりその他に、脳、肝臓、胎盤にも発現が認められた。

COS7 細胞に発現させた LZK は SDS-PAGE 上で 135-150kDa の分子量を示し、主に膜画分に存在していた。LZK 自体は膜貫通領域を持たないことから細胞内で他のタンパク質や脂質と会合することにより膜画分に結合していると考えられた。また LZK を免疫沈降した後、二価カチオンと ATP 存在下でインキュベートしたところ自己リン酸化が検出され、このタンパク質が実際に活性をもつキナーゼであることが確認された。この時リン酸基はセリン／トレオニン残基に転移されていた。また LZK を強制発現させた COS7 細胞では、c-Jun のリン酸化の亢進と JUK 活性の上昇が確認された。このことから LZK の生理的役割の一つは JNK/SAPK 経路の活性化であることが示された。

次に申請者はヒト LZK の翻訳領域および 5' 側非翻訳領域のゲノム上での遺伝子構造について研究を行った。その結果、ヒト LZK の翻訳領域は 13 個のエキソンから成り、両端に位置するエキソンはそれぞれ 5' 側非翻訳領域と 3' 側非翻訳領域の一部を含んでいることが分かった。また FISH 法を用いてヒト LZK の染色体上での位置を解析したところヒト LZK 遺伝子は第三染色体の長腕 3q27 にマップされた。5' RACE 法によって mRNA の 5' 非翻訳領域を解析したところ、ヒト LZK mRNA の 5' 側非翻訳領域は臓器によって異なる構造をしており、ヒト LZK mRNA の転写開始部位は臓器によって異なることが明らかとなった。それぞれの転写開始のプロモーター領域に相当すると思われる領域を単離し塩基配列を解析したところ、それぞれの領域はプロモーターとして異なる性質を示すことが示唆された。

以上、本研究は、神経系に特徴的な細胞内骨格タンパク質のリン酸化型を認識する新しい抗体の作成に成功し、さらに新規なプロテインキナーゼを発見したものであり、タンパク質の機能調節及び細胞内シグナル伝達におけるタンパク質リン酸化修飾の意義の解明に重要な知見を与えるものである。

論文審査の結果の要旨

本論文は二章に分かれており、第一章は神経系に特徴的な細胞骨格タンパク質のリン酸化を認識する単クローン抗体の作成に関する研究成果、第二章は新規プロテインキナーゼ遺伝子の単離、およびその生化学的・分子生物学的性質に関する研究成果である。

申請者は、まず、幼弱ラット脳の膜画分を免疫原として単クローン抗体 5A7 を得た。mAb5A7 は幼弱ラット脳で一部の神経細胞とグリア細胞のファイバー状構造を特異的に認識した。生化学的手法を用いて解析したところ mAb5A7 は神経系の細胞内骨格タンパク質のうち、リン酸化されたニューロフィラメント M とネスチンの両者を認識することが明らかとなった。ニューロフィラメント M 分子上の mAb5A7 が認識するエピトープはリン酸化されたテイルドメインにあることが明らかとなった。mAb5A7 はニューロフィラメント M とネスチンの両者を認識する初めての単クローン抗体である。

申請者はさらに、機能未知のラット cDNA フラグメントをプローブとして、ヒト小脳 cDNA ライブラリーをスクリーニングした結果、新規の MLK (Mix Lineage Kinase) をクローニングすることに成功した。MLK は最近発見されたプロテインキナーゼ群であり、その特徴として分子内にセリン／トレオニンキナーゼとチロシンキナーゼの両者の特徴を兼ね備えたハイブリッド型のキナーゼ触媒ドメインおよびロイシンジッパー構造をもつ分子である。得られた cDNA は 3569bp よりなり、2898bp の全長翻訳領域を含んでいた。塩基配列から推定されたアミノ酸配列より、本タンパク質は 966 アミノ酸残基よりなり、キナーゼ触媒ドメイン、ロイシンジッパードメイン、および酸性アミノ酸ドメインを含み、シグナルペプチドや膜貫通領域は含まなかった。申請者らは本タンパク質を LZK (Leucine-Zipper bearing Kinase) と命名した。ノーザンブロット解析により臓器分布を検討したところ LZK mRNA は脾臓に最も高発現しておりその他に、脳、肝臓、胎盤にも発現が認められた。

COS7 細胞に発現させた LZK は SDS-PAGE 上で 135-150kDa の分子量を示した。また LZK を免疫沈降し二価カチオンと ATP 存在下でインキュベートしたところ自己リン酸化が検出され、このタンパク質が実際に活性をもつキナーゼであることが確認された。この時セリン／スレオニン残基がリン酸化された。また LZK を強制発現させた COS7 細胞では、c-Jun のリン酸化の亢進と JUK 活性の上昇が確認された。このことから LZK の生理的役割の一つは JNK/SAPK 経路の活性化であることが示された。

次に申請者はヒト LZK の翻訳領域および 5' 側非翻訳領域のゲノム上での遺伝子構造を解析し、ヒト LZK の翻訳領域は 13 個のエキソンから成ることを明らかにした。また FISH 法によりヒト LZK 遺伝子は第三染色体の長腕 3q27 にマップされた。

以上、本研究は、神経系に特徴的な細胞内骨格タンパク質のリン酸化型を認識する新しい抗体を得、さらに新規なプロテインキナーゼ遺伝子のクローニングに成功したものであり、細胞内シグナル伝達におけるタンパク質リン酸化修飾の意義に関して重要な知見を与えるものである。

よって本論文は博士(薬学)の論文として価値あるものと認める。更に、平成 9 年 2 月 24 日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。